

بهینه سازی بیان، استخراج و تخلیص ناحیه N- ترمینال ژن IpaD شیگلا دیسانتری با استفاده از آنالیز پروتئومیکسی

مهدی حصارکی^۱، دکتر مجتبی سعادت^{۱*}، دکتر حسین هنری^۱، دکتر غلامرضا اولاد^۱، محمد هیئت^۲،
مختار زارع^۱

^۱مرکز تحقیقات زیست شناسی، دانشگاه جامع امام حسین (ع)، تهران، ایران؛ ^۲مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی
بقیه الله الاعظم (عج)، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۱/۱۴ اصلاح نهایی: ۹۰/۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۰/۲/۲۸

چکیده:

زمینه و هدف: باکتری شیگلا دیسانتری یکی از عوامل پاتوژن مهم است که علی رغم تلاش های چندین ساله برای تهیه واکسن علیه آن هنوز مطالعات گسترده پیرامون آن ادامه دارد. محصولات پلاسمید تهاجمی شیگلا (Ipa) نقش مهمی در تهاجم باکتری ایفا می کنند. پروتئین IpaD یکی از اعضای این خانواده است که به عنوان کاندید واکسن شیگلا مطرح می باشد. مطالعات متعدد بر روی این پروتئین نشان داده که ناحیه N- ترمینال آن نقش مهمی در فرآیند تهاجمی باکتری دارد. این مطالعه با هدف بهینه سازی بیان N- ترمینال ژن IpaD به منظور افزایش تولید پروتئین نو ترکیب انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی باکتری *E. coli* BL21(DE3) حامل پلاسمید pET-28a که ژن ناحیه N- ترمینال IpaD در آن همسانه سازی شده بود جهت مطالعات مورد استفاده قرار گرفت. پس از کشت باکتری، تاثیر سه فاکتور زمان القا، دما و غلظت ماده القا کننده ایزو-پروپیل-تایوتا دی گالاکتوپیرانوزید (IPTG) بر میزان بیان، با استفاده از ژل سدیم دو سولفات-پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) به صورت کیفی بررسی گردید. با استفاده از تصاویر دو بعدی تهیه شده از ژل ها با کمک نرم افزار آنالیز ژل های دو بعدی بررسی کمی بیان پروتئین صورت پذیرفت. مراحل استخراج و تخلیص پروتئین نو ترکیب با کمک روش شیب اوره آغاز و با عبور نمونه ها از ستون کروماتوگرافی پایان یافت.

یافته ها: نتایج بر روی ژل های SDS-PAGE نشان داد که میزان تقریباً مشابهی از تولید پروتئین نو ترکیب در زمان القا، دما و غلظت های مختلف IPTG بیان وجود دارد، اما یافته های نرم افزاری نشان داد بهترین شرایط بیان ناحیه N- ترمینال پروتئین IpaD در وکتور pET-28a دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، غلظت ۰/۷ میلی مولار IPTG و زمان ۳ ساعت بعد از القا می باشد.

نتیجه گیری: بر اساس نتایج این مطالعه هر پروتئین بعد از فرآیند همسانه سازی شرایط بیان مخصوص به خود را دارا می باشد که شرایط دمایی و طول زمان القا سلول ها در مقدار تولید پروتئین موثرتر می باشند.

واژه های کلیدی: شیگلا دیسانتری، پلاسمید تهاجمی، پروتئین نو ترکیب، پروتئومیکس.

مقدمه:

سوئی تقسیم می شوند. از میان این چهار گونه، شیگلادیسانتری به دلیل تولید توکسین از اهمیت خاصی برخوردار است. این باکتری باعث بیماری شینگلوزیس شده که در این بیماری قسمتی از روده کوچک

باکتری شیگلا به عنوان یکی از اعضای خانواده بزرگ انتروباکتریاسه شامل باسیل های گرم منفی و بدون اسپور است که بر اساس O آنتی ژن لیپوپلی ساکارید به چهار گروه دیسانتری، فلکسنری، بوئیدی و

*نویسنده مسئول: تهران-دانشگاه جامع امام حسین (ع)، دانشکده علوم پایه- مرکز تحقیقات زیست شناسی- تلفن: ۰۲۱-۷۷۱۰۴۹۳۴

تحت تاثیر قرار می گیرد. بیشتر علائم عفونی شیگلا شامل: اسهال، تب، حالت تهوع، استفراغ، گرفتگی و درد شکمی و ظهور خون، موکوس در مدفوع می باشد (۳،۲،۱).

طبق گزارش انتشار یافته از سوی سازمان بهداشت جهانی تا سال ۲۰۰۹، حدود ۱۶۴/۷ میلیون نفر در جهان به بیماری شیگلوزیس مبتلا شده اند که از این میان ۱۶۳/۲ میلیون نفر در کشورهای در حال توسعه و ۱/۵ میلیون نفر در کشورهای توسعه یافته بوده اند. هر ساله زندگی ۱/۱ میلیون نفر توسط شیگلا تهدید می شود که از این میان ۵۸۰ هزار مورد ابتلا به شیگلوزیس طی بازگشت از کشورهای در حال توسعه گزارش شده است (۴). به علت عفونت زایی بالای این باکتری حتی در تعداد کم آن (حتی کمتر از ۱۰۰ عدد از میکرو ارگانیسم)، بر اهمیت پیشگیری و درمان این عامل بیماری را می افزاید. شیگلا معمولاً در مخاط روده قرار می گیرد و در خون و احشا داخل نمی شود. علامت تشخیص شیگلوزیس در بیشتر بیماران بر اساس خون موجود در مدفوع می باشد (۵،۶،۷). بیماری زایی شیگلا به سه فاکتور قدرت تهاجم، اندوتوکسین و اگزوتوکسین وابسته است. قدرت تهاجم این باکتری تا حد زیادی به محصولات پلاسمید تهاجمی (Ipa) این باکتری و عامل انتشار بین سلولی آن (VirG) وابسته است. خطرناکترین اگزوتوکسین شیگلا Shigatoxin (STX) می باشد که می تواند در بیماران ایجاد سندرم اورمی همولیتیک (HUS) کند (۸).

مکانیسم ورود شیگلا به سلول اپیتلیالی به یک سری از پروتئین های سطحی باکتری وابسته است. مهمترین پروتئین ها، توسط پلاسمید تهاجمی باکتری کد می شوند. این پروتئین ها شامل IpaA/B/C/D/H می باشند (۹). امروزه از میان این پروتئین ها، IpaB/C/D به عنوان کاندیدای واکسن شیگلا مطرح هستند. IpaD نقش مهمی در تهاجم باکتری و به سطح آمدن سایر پروتئین های موثر در تهاجم و بیماری زایی (IpaB/C) بازی می کند (۱۰،۱۱،۱۲).

پروتئین IpaD با وزن مولکولی ۳۷ کیلو دالتون،

ساختار دئبلی شکل به همراه یک ناحیه درون مولکولی پیچ در پیچ (coiled-coil) دارد. این پروتئین از ناحیه C- ترمینال خود به سیستم ترشحی نوع سوم باکتری (Type III secretion system) متصل است و از ناحیه N- ترمینال با محیط اطراف در تعامل مستقیم می باشد. مطالعات بیوشیمیایی و ساختاری که بر روی این پروتئین در سال ۲۰۰۸ در آمریکا صورت گرفت نشان داد ناحیه N- ترمینال IpaD در فرآیند تهاجمی باکتری نقش تاثیر گذاری دارد. تحقیقات بر روی نواحی سطحی اپیتوپ IpaD هم ثابت کرد که تقریباً تمام این نواحی در ناحیه N- ترمینال این پروتئین قرار دارند (۱۶-۱۳).

فرآیند مطالعاتی موثر در مقدار بیان پروتئین معمولاً با مطالعه تغییر فاکتورهای بیانی بر روی SDS-PAGE آغاز می شود و نتایج حاصل از آن به صورت کیفی و مشاهده مستقیم می باشد. مسلماً این روش مطالعه می تواند دارای خطا باشد. بدیهی است جهت بررسی کمی نیاز به استخراج، خالص سازی، غلظت سنجی پروتئین و نهایتاً بررسی مجدد بر روی ژل SDS-PAGE می باشد. اما به تازگی استفاده از روش تجهیزاتی و نرم افزاری (Melanie) گزارش گردیده است که می تواند ژل اولیه را به صورت دوبعدی آنالیز و ضمن سنجش کمی و کیفی تمام باندهای تفکیکی بر روی آن و همچنین تعیین دانسیته هر باند، نهایتاً میزان غلظت پروتئین بیانی نسبت به کل پروتئین های سلولی را ارزیابی نماید.

هدف از این مطالعه تغییر در فاکتورهای تاثیر گذار بیان و بررسی متنوع نتایج این تغییرات، جهت بهینه سازی بیان ناحیه N- ترمینال ژن IpaD به منظور افزایش تولید پروتئین نوترکیب، با استفاده از روش مستقیم تجهیزاتی - نرم افزاری می باشد.

روش بررسی:

در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی بعد از کسب اطلاعات ناشی از داده های کیفی به بررسی و مقایسه آن با نتایج کمی حاصل از نرم افزار پرداخته شد.

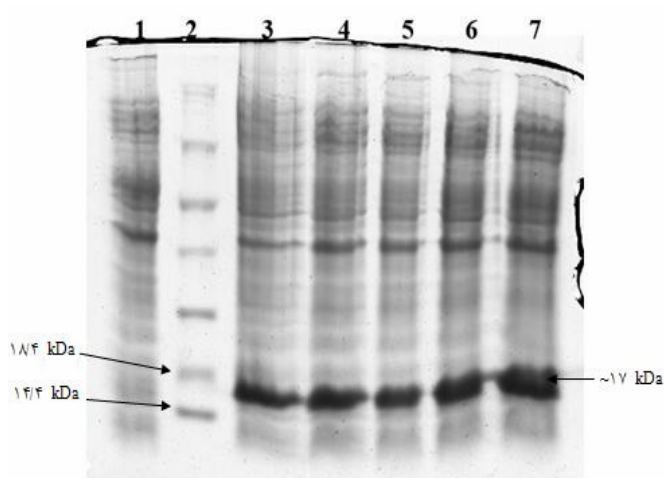
باکتری *E. coli* BL21(DE3) حامل پلاسمید pET-28a که ناحیه N-ترمینال ژن IpaD در آن همسانه سازی شده بود جهت مطالعات مورد استفاده قرار گرفت (۱۶). جهت بررسی بیان پروتئین نسبت به رشد باکتری اقدام گردید. به این منظور ابتدا از نمونه باکتری استوک (که در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری می گردید) در محیط لوریا برتانی (LB) مایع حاوی ۸۰ میلی گرم در میلی لیتر آنتی بیوتیک کانامایسین تلقیح و نسبت به رشد آن در شرایط ۱۵۰ دور در دقیقه و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد اقدام شد. پس از رسیدن جذب نوری (OD) به ۰/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر، القا بیان ژن به وسیله Isopropyl-β-D-thio-galactoside (IPTG) صورت گرفت. سپس باکتری در دماهای ۱۵، ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۶ ساعت و تحت غلظت‌های مختلف عامل القایی IPTG (۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷، ۱ میلی مولار) قرار گرفت. سپس نمونه‌ها در ۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و رسوب سلولی بعد از سونیکیت کردن (قدرت ۷۰٪ و پالس ۰/۵)، بر روی ژل ۱۲ درصد SDS-PAGE الکتروفورز شدند.

از ژل‌های رنگ آمیزی شده به روش کوماسی بلو تصویر دو بعدی با دستگاه Gs-800 calibrated Denstometer تحت نرم افزار 7.2.2 PD.Quest (Bio-Rad) تهیه گردید. سپس تصاویر تهیه شده با کمک نرم افزار Melanie 7 در راستای انتخاب بهترین دما و بهترین غلظت عامل القایی مورد مطالعه قرار گرفتند (۱۷، ۱۸، ۱۹).

با توجه به نتایج به دست آمده و مشخص شدن بهترین دما و مناسب ترین غلظت عامل القایی برای تعیین مدت زمان القا مجدداً بیان دیگری در زمان و غلظت IPTG ثابت (دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و غلظت ۰/۷ میلی مولار) و مدت زمان القا متغیر (۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ ساعت) گذاشته شد و سلول‌ها را بعد از رسوب دادن و سونیکیت کردن (قدرت ۷۰ درصد و پالس ۰/۵) بر روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز شدند و بعد از تهیه

تصاویر دوبعدی با نرم افزار 7 Melanie همانند مراحل فوق مورد بررسی قرار گرفت (۲۰، ۲۱). به منظور محلول سازی انکلوژن بادی‌ها و پروتئین بیان شده، از روش شیب افزایشی غلظت اوره استفاده گردید. در این فرآیند، ابتدا رسوب سلولی در ۱ میلی لیتر بافر نمکی فسفات (PBS) حل و بعد از شکستن توسط دستگاه Ultra sonicator (با قدرت ۷۰ درصد و پالس ۰/۵)، نمونه در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ دقیقه با ۱۴۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس فاز رویی حذف و مجدداً به رسوب حاصله ۱ میلی لیتر PBS اضافه کرده و بعد از مخلوط کردن در شرایط قبلی سانتریفوژ شد. به رسوب باقیمانده ۱ میلی لیتر PBS حاوی اوره ۲ مولار تیمار و مجدداً سانتریفوژ در شرایط قبلی صورت پذیرفت. پس از حذف مایع رویی مجدداً برای رسوب حاصل، این مرحله تکرار شد. در مرحله آخر، بعد از اضافه کردن ۱ میلی لیتر PBS حاوی اوره ۸ مولار به نمونه و بعد از مخلوط کردن، نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. نمونه حاصله از فرآیند شیب اوره پس از نگهداری ۴۸ ساعته در دمای ۴ درجه سانتیگراد، طبق شرایط فوق سانتریفوژ شد. فاز رویی بعد از عبور از فیلتر ۰/۴۸ میکرون، جهت تخلیص پروتئین نوترکیب در ستون کروماتوگرافی تلقیح شد. به منظور بررسی پروتئین فرآیند تخلیص نمونه‌های خارج شده در مراحل مختلف از ستون بر روی ژل SDS-PAGE الکتروفورز گردید (۲۲، ۲۳).

تعیین غلظت پروتئین تخلیص شده به کمک روش برادفورد انجام شد. در این راستا بعد از تهیه آلبومین سرم گاوی (BSA) از شرکت سیناژن براساس میزان جذب (OD) نمودار استاندارد در طول موج ۵۹۵ نانومتر رسم گردید و در مرحله بعد با استفاده از آن، نمودار غلظت پروتئین‌های نوترکیب تخلیص شده تخمین زده شد (۲۴).



تصویر شماره ۲: تصویر ژل SDS-PAGE، بیان پروتئین ناحیه N-ترمینال ژن IpaD در دمای ثابت ۳۰ درجه سانتی گراد پس از ۶ ساعت القا در غلظت های متغیر عامل القایی (IPTG)

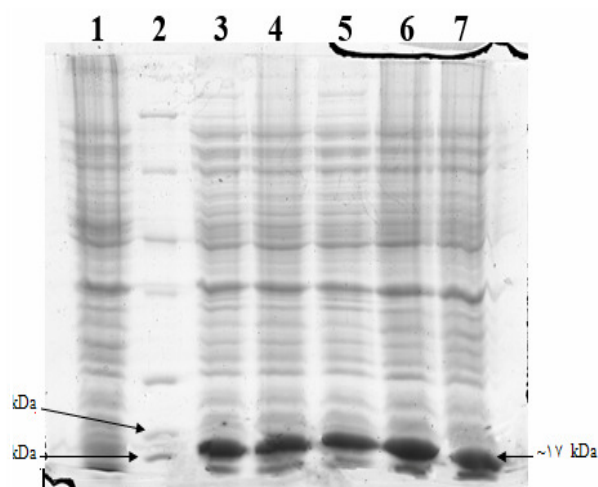
چاهک ۱: نمونه کنترل بدون عامل القایی (IPTG).

چاهک ۲: مارکر پروتئینی SM0431 فرمتناز.

چاهک ۳-۷ به ترتیب غلظت های ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ و ۱ میلی مولار غلظت IPTG

SDS-PAGE: سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل آمید

IPTG: ایزو-پروپیل-تایوتنا دی گالاتوپیرانوزید



تصویر شماره ۱: تصویر ژل SDS-PAGE، بیان پروتئین ناحیه N-ترمینال ژن IpaD در دمای ثابت ۲۵ درجه سانتی گراد پس از ۶ ساعت القا در غلظت های متغیر عامل القایی (IPTG).

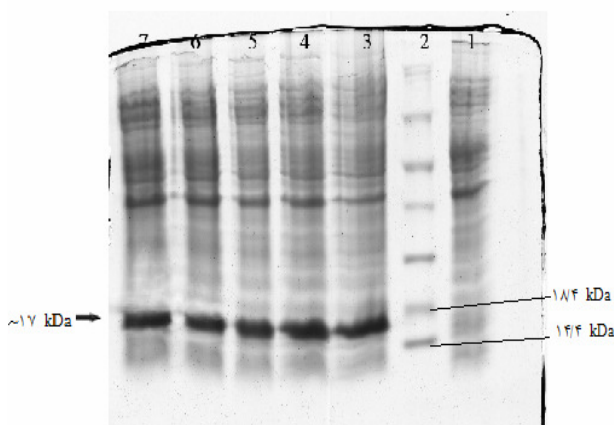
چاهک ۱: نمونه کنترل بدون عامل القایی (IPTG).

چاهک ۲: مارکر پروتئینی SM0431 فرمتناز.

چاهک ۳-۷ به ترتیب غلظت های ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ و ۱ میلی مولار غلظت IPTG

SDS-PAGE: سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل آمید

IPTG: ایزو-پروپیل-تایوتنا دی گالاتوپیرانوزید



تصویر شماره ۴: تصویر ژل SDS-PAGE، بیان پروتئین ناحیه N-ترمینال ژن IpaD در دمای ثابت ۳۷ درجه سانتی گراد با غلظت نهایی ۰/۷ میلی مولار عامل القایی (IPTG) تا ۵ ساعت بعد از القا

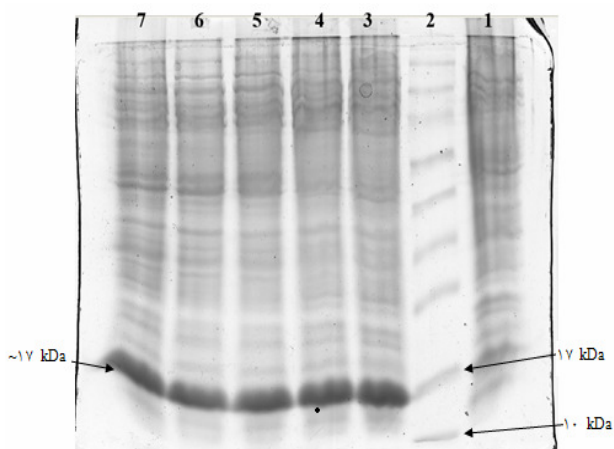
چاهک ۱: نمونه کنترل بدون عامل القایی (IPTG).

چاهک ۲: مارکر پروتئینی SM0431 فرمتناز.

چاهک ۳-۷ به ترتیب ۱-۵ ساعت بعد از القا

SDS-PAGE: سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل آمید

IPTG: ایزو-پروپیل-تایوتنا دی گالاتوپیرانوزید



تصویر شماره ۳: تصویر ژل SDS-PAGE، بیان پروتئین ناحیه N-ترمینال ژن IpaD در دمای ثابت ۳۷ درجه سانتی گراد پس از ۶ ساعت القا در غلظت های متغیر عامل القایی (IPTG).

چاهک ۱: نمونه کنترل بدون عامل القایی (IPTG).

چاهک ۲: مارکر پروتئینی SM0431 فرمتناز.

چاهک ۳-۷ به ترتیب غلظت های ۰/۱، ۰/۳، ۰/۵، ۰/۷ و ۱ میلی مولار غلظت IPTG

SDS-PAGE: سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل آمید

IPTG: ایزو-پروپیل-تایوتنا دی گالاتوپیرانوزید

جدول شماره ۱: نتایج تراکم سنجی به روش نرم افزاری و غلظت سنجی پروتئین بیانی به روش برادفورد در دمای**ثابت (۶ ساعت)، دمای متغیر و غلظت مختلف IPTG**

غلظت کل پروتئین (mg)	سطح اشغالی / تراکم پروتئین (I/A)	سطح اشغالی (A)	تراکم پروتئین (I)	غلظت IPTG (mM)	دمای القایی
۵۳	۷۶/۲۱۹۱	۵۷/۰۸۵۴	۴۳۵۱	۱	۳۷
۵۳	۷۶/۳۹۲۶	۵۵/۵۴۲۰	۴۲۴۳	۰/۷	۳۷
۴۲	۵۵/۶۱۴۹	۵۴/۲۶۶۰	۳۰۱۸	۱	۳۰
۴۲	۷۱/۸۰۹۹	۴۲/۵۸۴۶	۳۰۵۸	۰/۷	۳۰
۳۷	۷۴/۹۸۱۲	۴۷/۳۱۸۵	۳۵۴۸	۱	۲۵
۳۷	۷۴/۹۷۷۵	۴۶/۴۸۰۶	۳۴۵۸	۰/۷	۲۵

IPTG: ایزو-پروپیل-تایوتنا دی گالاتئوپیرانوزید

یافته‌ها:

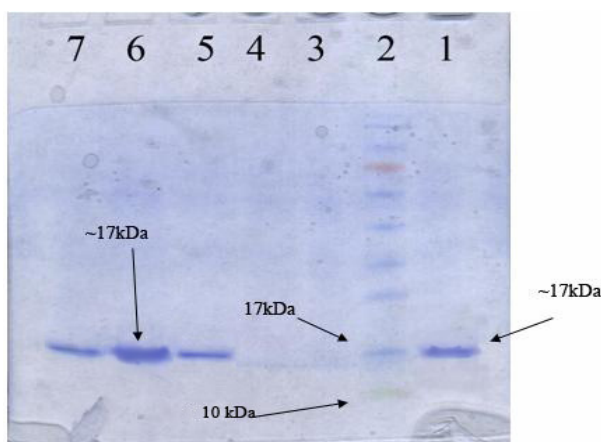
غلظت ۰/۷ میلی مولار از عامل القایی، پروموتور و کنور به وسیله IPTG تقریباً اشباع شده و افزایش مقدار عامل القایی نمی‌تواند در مقدار بیان پروتئین نو ترکیب تاثیر مشخصی بگذارد (تصاویر شماره ۳-۱ و جدول شماره ۱). بعد از مشخص شدن دمای بهینه بیان و غلظت عامل القایی جهت به دست آوردن مدت زمان بیان، بعد از القا نمونه‌هایی با فاصله زمانی یک ساعت از هم تهیه گردید و مشخص شد که بیشترین بیان در سه ساعت ابتدایی بوده و بعد از سه ساعت مقدار بیان کاهش پیدا کرده است (تصویر شماره ۴ و جدول شماره ۲).

در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد مقدار بیان و تولید پروتئین بسیار ناچیز بود، لذا سبب حذف ادامه مطالعات در این شرایط دمایی گردید. مقایسه مقدار پروتئین بیان شده در دماهای ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی گراد و غلظت‌های مختلف عامل القایی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در غلظت‌های ۰/۷ و ۱ میلی مولار IPTG بیشترین غلظت پروتئین بیانی مشاهده شد. نتایج به وضوح نشان داد که با افزایش دما (تا ۳۷ درجه سانتیگراد)، مقدار غلظت پروتئین نو ترکیب افزایش یافته است. همچنین این مطالعات نشان داد که تقریباً در

جدول شماره ۲: نتایج تراکم سنجی به روش نرم افزاری و غلظت سنجی پروتئین بیانی به روش برادفورد در دمای**ثابت ۳۷ درجه سانتی گراد، غلظت ثابت ۰/۷ میلی مولار IPTG و زمان‌های مختلف بیان**

مدت زمان القای (h)	تراکم پروتئین (I)	سطح اشغالی (A)	سطح اشغالی / تراکم پروتئین (I/A)	غلظت کل پروتئین (mg)
۱	۲۱۰۶/۰۰	۳۹/۰۵۱۸	۵۳/۹۲۸۳	۳۳
۲	۲۹۴۸/۰۰	۴۳/۸۰۹۸	۶۷/۲۹۰۸	۴۷
۳	۲۸۴۸/۰۰	۳۶/۴۰۵۱	۷۸/۲۳۰۷	۶۲
۴	۲۷۷۱/۰۰	۳۵/۵۶۲۴	۷۷/۹۱۹۳	۵۸
۵	۳۲۱۱/۰۰	۴۱/۷۶۸۱	۷۶/۸۷۶۸	۵۵

IPTG: ایزو-پروپیل-تایوتنا دی گالاتئوپیرانوزید



تصویر شماره ۶: ژل *SDS-PAGE*، تایید تخلیص پروتئین نو ترکیب با استفاده از ستون کروماتوگرافی.

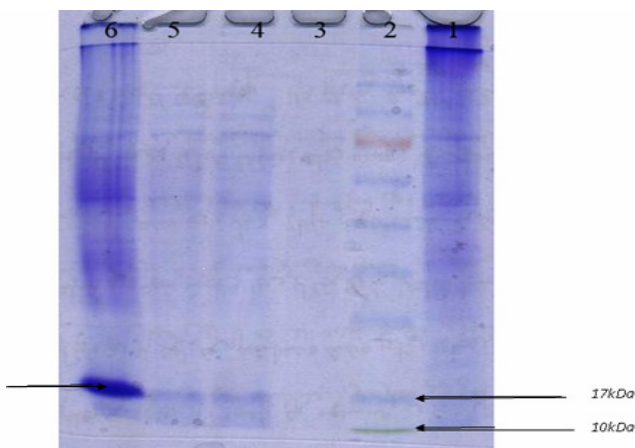
چاهک ۱: نمونه حاوی پروتئین قبل از ستون.
چاهک ۲: نشانگر پروتئینی SM0671 فرمتناز.
چاهک ۳: بافر F بعد از عبور از ستون.
چاهک ۴: بافر C دناتور.
چاهک ۵: بافر D دناتور.
چاهک ۶: بافر E دناتور.
چاهک ۷: بافر MES.

SDS-PAGE: سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل آمید
PBS: بافر نمکی فسفات

نو ترکیب تولید شده به مقدار زیاد نیاز باشد و همچنین حفظ ساختار پروتئینی اهمیت داشته باشد. جهت مطالعات این ناحیه از پروتئین، نیاز به همسانه سازی داشت که این کار در مراحل قبلی صورت پذیرفته بود (۱۶). در ادامه نیاز به بیان این ناحیه، بهینه سازی بیان و تخلیص پروتئین نو ترکیب بود.

هر پروتئین با توجه به مقدار بیان و ساختار و توالی آن شرایط بیانی خاص خود را دارا می باشد. از این رو برای دستیابی به شرایط بهینه بیان پروتئین نو ترکیب، نیاز به بهینه سازی شرایط بود.

آنچه که این بررسی را از دیگر مطالعات متمایز می کند این است که در ابتدا نسبت به مشاهده و نتیجه گیری از روی ژل های *SDS-PAGE* حاصل از نمونه ها اقدام شد و در ادامه با استفاده از تصاویر



تصویر شماره ۵: بررسی حلالیت پروتئین نو ترکیب با استفاده از روش شیب افزایشی غلظت اوره در ژل *SDS-PAGE*

چاهک ۱: فاز رویی بعد از سانتریفوژ با ۱ PBS.
چاهک ۲: نشانگر پروتئینی SM0671 فرمتناز.
چاهک ۳: فاز رویی بعد از سانتریفوژ با ۲ PBS.
چاهک ۴: فاز رویی بعد از سانتریفوژ با ۲ PBS حاوی اوره ۲ مولار (مرحله اول).
چاهک ۵: فاز رویی بعد از سانتریفوژ با ۲ PBS حاوی اوره ۲ مولار (مرحله دوم).
چاهک ۶: فاز رویی بعد از سانتریفوژ با ۲ PBS حاوی اوره ۸ مولار.
SDS-PAGE: سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل آمید
PBS: بافر نمکی فسفات

پس از مشخص شدن نامحلول بودن پروتئین بیانی، برای محلول ساختن این انکلوژن بادی ها نیاز بود تا طی روشی این فشردگی و تراکم پروتئین بیانی از هم باز شوند. از این رو، از شیب اوره به عنوان یک روش نامتداول در استخراج پروتئین های نامحلول کمک گرفته شد و پروتئین در بافر B دناتور محلول گردید (تصویر شماره ۵).

مرحله آخر تخلیص پروتئین نو ترکیب با استفاده از ستون کروماتوگرافی نیکل (کیاژن) انجام و پروتئین نو ترکیب با غلظت مناسب تخلیص گردید (تصویر شماره ۶).

بحث:

تولید پروتئین نو ترکیب بعد از همسانه سازی توالی ژنی و کتورهای بیانی از اهمیت خاصی برخوردار است. این اهمیت زمانی پر رنگ تر می شود که پروتئین

دوبعدی و آنالیز نرم افزاری این امکان را فراهم آورد تا در انتخاب شرایط بهینه بیان، درصد خطا در انتخاب شرایط بهینه کاهش چشمگیری پیدا کند.

با توجه به نقش دما بر روی تولید پروتئین، این فاکتور مورد بررسی قرار گرفت. در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد مقدار بیان و تولید پروتئین بسیار ناچیز بود، لذا سبب حذف ادامه مطالعات در این شرایط دمایی گردید. مقایسه مقدار پروتئین بیان شده در دماهای ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سانتیگراد و غلظت‌های مختلف عامل القایی در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در غلظت‌های ۰/۷ و ۱ میلی مولار IPTG بیشترین غلظت پروتئین بیانی مشاهده شد. نتایج به وضوح نشان داد که با افزایش دما (تا ۳۷ درجه سانتیگراد)، مقدار غلظت پروتئین نو ترکیب افزایش یافته است. همچنین این مطالعات نشان داد که تقریباً در غلظت ۰/۷ میلی مولار از عامل القایی، پروموتور وکتور به وسیله IPTG تقریباً اشباع شده و افزایش مقدار عامل القایی نمی‌تواند در مقدار بیان پروتئین نو ترکیب تاثیر مشخصی بگذارد. طول مدت القاء به عنوان یک فاکتور مهم دیگر، عامل دیگری بود که مورد مطالعه قرار گرفت. غلظت پروتئین بیانی در طول ۵ ساعت بعد از القاء مورد بررسی کمی قرار گرفت. انتخاب بیشترین مقدار بیان اگر فقط با مشاهده ژل SDS-PAGE تغییرات مدت زمان القاء انجام می‌گرفت، انتخاب زمان مناسب با درصد بالایی دارای خطا می‌باشد و این عامل مهمی بود تا ادامه مطالعات به سمت مطالعات نرم افزاری هدایت شود. مقدار پروتئین زمان‌های ۱، ۲ و ۳ ساعت پس از القاء به افزایش بود و در زمان‌های ۴ و ۵ ساعت بعد از القاء به طور غیر منتظره‌ای کاهش پیدا کرد. احتمال داده می‌شود که علت این فرآیند به دلیل ورود باکتری به فاز مرگ و یا تخریب پروتئین با گذشت زمان توسط پروتازهای سلولی باشد. در انتهای مطالعات مشخص شد که پروتئین نو ترکیب (N-ترمینال IpaD) در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، غلظت ۰/۷ میلی مولار IPTG و ۳ ساعت

بعد از القاء، بیشترین بیان را دارد. در مطالعه‌ای مشابه در سال ۲۰۰۷ که پروتئین هلیکوپاکتریپیلوری در باکتری *E. coli* BL21(DE3) درون پلاسمید pET-28a همسانه سازی و اثر غلظت‌های متفاوتی از عامل القایی (۱-۰ میلی مولار)، مدت زمان القاء (۴-۱ ساعت) و دماهای مختلف (۳۷ و ۱۸ درجه سانتیگراد) که در بیان پروتئین موثرند مطالعه شده بود و در نهایت دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، زمان ۴ ساعت و غلظت ۰/۴ میلی مولار از عامل القایی به عنوان شرایط بهینه در بیان پروتئین مورد مطالعه گزارش شد (۲۵). در مطالعه‌ای دیگر Wang و همکارانش با همسانه سازی ژن *Hgf1* (Hydrophobin from *grifola frondosa*) در وکتور pET28a جهت افزایش تولید پروتئین نو ترکیب در باکتری *E. coli* BL21، با بهینه سازی بیان ژن توسط تغییرات فاکتورهای کلیدی بیان مقدار پروتئین تولید شده را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعات بهترین شرایط برای بیان این ژن دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، زمان ۵ ساعت القاء و غلظت ۰/۷ میلی مولار گزارش شده است (۲۶).

پس از مشخص شدن شرایط بهینه بیانی، جهت تخلیص پروتئین نو ترکیب با افزایش حجم بیان در شرایط بهینه فرآیند مطالعات ادامه پیدا کرد. بررسی‌ها نشان داد که پروتئین بیان شده به حالت نامحلول بوده و نیاز داشت که از بافر دناتوره کننده B (حاوی اوره ۸ مولار) جهت فرآیند تخلیص استفاده شود. اما با اضافه کردن بافر دناتور (B) پروتئین به فاز محلول وارد نشد و این عاملی بود که باعث شد از روش نامتعارف که به روش شیب اوره معروف می‌باشد پروتئین بیان شده را که به صورت انکلوژن بادی‌های فشرده بود در فاز محلول آورده تا فرآیند تخلیص با کمک ستون کروماتوگرافی تمایلی نیکل انجام و پروتئین نو ترکیب با غلظت مناسبی تخلیص گردید.

نتیجه گیری:

می‌توان بر اساس نتایج این مطالعه و مطالعات

تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از همکاری آقای جواد قره چاهی که در مطالعات نرم افزاری همکاری نمودند و در پیشبرد این تحقیق ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می گردد.

مشابه می توان اینگونه بیان کرد که هر پروتئین بعد از فرآیند همسانه سازی شرایط بیان مخصوص به خود را دارا می باشد که شرایط دمایی و طول زمان القا سلول ها در مقدار تولید پروتئین موثرتر می باشد.

منابع:

1. Swapan Kuma N. Shigellosis. J Microbiol. 2005; 43(2): 133-43.
2. Sur D, Ramamurthy T, Deen J, Bhattacharya SK. Shigellosis: challenge & management issues. Indian J Med Res. 2004; 120 (5): 454-62.
3. Pupo MG, Lan R, Reeves PR. Multiple independent origins of *Shigella* clones of *E.coli* and convergent evolution of many of their characteristics. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97(19): 1056-72.
4. Shigellosis. Iarrrhoeal diseases [Internet]. California daily research foundation 2008 [cited 2012feb26]. Available from: http://www.who.int/vaccine_research/iseases/iarrrhoeal/en/index6.html
5. Ogawa M, Sasakawa C. Intracellular survival of *Shigella*. Cell Microbiol. 2006; 8(2): 177-4.
6. Dupont HL, Levin M, Hornick R, Formal S. Inoculum size in Shigellosis and implications for expected mode of transmission. J Infect Dis. 1989; 159(6): 1126-8.
7. Sansonetti PJ. War and peace at mucosal surfaces. Nat Rev Immunol. 2004; 4(12): 953-64.
8. Capozzo A, Creydt V, Dran G, Fernandez G, Gomez S, Bentancor L, et al. Development of DNA vaccines against hemolytic-uremic syndrome in a murine model. Infect Immun. 2003; 71(7): 3971-8.
9. Gunnar N, Schroeder EH. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. Clin Microbiol Rev. 2008; 21(1): 134-56.
10. Sansonetti PJ. Rupture invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by *Shigella*: the yin and yang of innate immunity. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2006; 17(2): 117-9.
11. Man A, Prieto G, Nicoletti C. Improving M-cell-mediated transport across mucosal barriers. Immunology. 2004; 11(3): 15-22.
12. Bahrani F, Sansonetti P, Parson C. Secretion of Ipa proteins by *Shigella flexneri*: inducer molecules and kinetics of activation. Infect Immun. 1997; 65(10): 4005-10.
13. Menard R, Parson C, Gounon P, Sansonetti P, Dehio C. The secreted IPA complex of *Shigella flexneri* promotes entry into mammalian cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1996 Feb; 93(3): 1254-8.
14. Amanda T, Harrington D, Hearn L, Picking R, Barker W, William D. Structural characterization of the N-terminal of IpaD from *Shigella flexneri*. Infect Immun. 2003 Mar; 71(3): 1255-64.
15. Stensrud K, Aam P. Deoxycholate Interacts with IpaD of *Shigella flexneri* in Inducing the Recruitment of IpaB to the Type III Secretion Apparatus Needle Tip. J Biol Chem. 2008; 283(27): 18646-54.

16. Heiat M, Saadati M, Nazarian S, Barati B, Honari H, Doroudian M, et al. 'Cloning and exparession of n-terminal region of IpaD from *Shigella dysenteriae* in *E.Coli*, Paramedical Sciences. 2010; 1(4): 12-7.
17. Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning laborator manual. 3rd ed. NewYork: CSHL Press; 2001.
18. Berth M, Moser M, Kolbe M, Bernhardt J. The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis image. Appl Microbiol Biotechnol. 2007 Oct; 76(6): 1223-43
19. Geneva Bioinformatics (GeneBio) SA, [internet] Geneva 2011 [cited 2012] Available from: <http://www.Genebio.com/products/melanie/faq.html>.
20. Kumar Y, Uppuluri N, Babu K, Kishore P, Kumar P, Ballal S, et al. Proteomics of renal disorders: Urinary proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry'. Current Science.2002; 82(6): 655-63.
21. Grunberg K, Muller E, Otto A, Reszka R, Linder D, Kube M, et al. Biochemical and proteomic analysis of the magnetosome membrane in magnetospirillum gryphiswaldense. Appl Environ Microbiol. 2004; 70(4): 1040-50.
22. Wingfield P, Palmer I, Liang SM. Folding & Purification of Insoluble (Inclusion - Body) Protein from *E. coli*. Curr Protoc Protein Sci. 2001 May; Chapter 6: Unit 6.5.
23. Palmer I, Wingfield PT. Preparation and extraction o f unit 6.3 insoluble (inclusion-body) proteins from escherichia coli. Curr Protoc Protein Sci. 1995; 6(3): 1-5.
24. Bradford MM. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantitties of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976 May; 72: 248-54.
25. Psakis G, Nitschkowski S, Holz C, Krebs D, Maestre M, Polaczek J. et al. Expression screening of integral membrane proteins from helicobacter pylori 26695. Protein Sci. 2007 Dec; 16(12): 2667-76.
26. Wang Z, Feng S, Huang Y, Qiao M, Zhang B, Xu H. Prokaryotic expression, purification, and polyclonal antibody production of a Hydrophobin from grifola frondosa. Acta Biochim Biophys.2010; 42: 388-95.

Optimization of expression, extraction & purification of the N-terminal region of ipaD gene in *Shigella dysenteriae* by proteomics analysis

Hesaraki M (MSc)¹, Saadati M (PhD)^{1,2*}, Honari H (PhD)¹, Olad G (PhD)¹, Heiat M (MSc)², Zare M (MSc)¹

¹Biological Sciences Research Center, Imam Hossein University, Tehran, I.R. Iran;

²Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University, Tehran, I.R. Iran.

Received: 3/Feb/2011

Revised: 9/Apr/2011

Accepted: 18/May/2011

Background and aims: *Shigella dysenteriae* is one of the most important pathogens which in spite of many attempts vaccine preparation, extended researches are still in the way, Transport and surface expression of the invasion plasmid antigens (IpaD proteins) have essential role in the pathogenicity of *Shigella* spp. IpaD has been one of the most important proteins for *Shigella* vaccine candidate. Studies have shown that N –terminal region of this protein has a key role in the pathogen city and invasion. This study was done to evaluate the optimization of N-terminal region of Ipad in order to increase the production of recombinant protein.

Methods: In this experimental laboratory study, desired region of IpaD cloned in vector pET-28a (+). For confirming cloning procedure ,standard tests were performed. The effect of IPTG concentration, temperature & induction times on the level of protein expression were evaluated by SDS-PAGE, qualitatively. The gels were evaluated with 2-D gel analysis software (Melanie 7). The recombinant protein was extracted by Urea & eventually purified with affinity chromatography column.

Results :SDS-PAGE analysis showed that approximately the same amount of recombinant protein is expressed at different times, but software analysis proved that the optimized condition for the expression of recombinant protein was in the final concentration of 0.7 mM of IPTG, 37°C and 3 hours induction.

Conclusion: According to the results every protein has its own expression after the homogenization process, and the temperature and the cells induction time length are more effective in the amount of protein production.

Keywords : Invasion plasmid, Recombinant protein, Proteomics, *Shigella dysenteriae*.

Cite this article as: Hesaraki M, Saadati M, Honari H, Olad G, Heiat M, Zare M. [Optimization of expression, extraction & purification of the N-terminal region of ipaD gene in *Shigella dysenteriae* by proteomics analysis. J Shahrekord Univ Med Sci. 2012 May, Jne; 14(2): 64-73.]Persian

Corresponding author:

Biological Sciences Research Center, Basic sciences faculty, Imam Hossein University, Tehran, I.R. Iran. Tel: 00982177104934, E-mail:Saadati_m@yahoo.com